

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 29 645.6

Anmeldetag: 2. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: IBIS GmbH Bio Innovationen,
Oberschleißheim/DE

Bezeichnung: Zellaufschluss von Bakterien

IPC: C 12 N 1/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte

European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN (bis 31.1.01)
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKÄ
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSPERGER
DIPL.-PHYS. DR.-ING. V. JORDAN
DIPL.-CHEM. DR. M. DEY
DIPL.-FORSTW. DR. J. LACHNIT

Unser Zeichen:
28099P DE/MDwr

Anmelder:
IBIS GmbH Bio Innovationen
Erlenweg 7

85764 Oberschleißheim
DE

Zellaufschluss von Bakterien

Zellaufschluss von Bakterien

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Substanzen, die an den bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu binden zum Zellaufschluss bzw. zur Lyse von Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Zellaufschlusssystem bzw. ein Zellaufschlussverfahren.

10

Zellen, insbesondere Bakterienzellen, werden häufig eingesetzt, um unter Anwendung molekulargenetischer Techniken, beispielsweise durch homologe oder heterologe Genexpression und Expression synthetisch wirksamer Enzyme, Verbindungen zu produzieren. Bevorzugt werden peptidische Verbindungen, Triglyceride, Wachsester und PHAs produziert und insbesondere solche Verbindungen, welche in der Biotechnologie, der Medizin, auf dem Pharmasektor oder in anderen Bereichen Anwendung finden können. Im Falle der heterologen Genexpression sind die gebildeten Verbindungen nicht-natürliche Komponenten der verwendeten Zellen bzw. der verwendeten Bakterien. Die Herstellung von verschiedensten Verbindungen mittels Genexpression ist im Stand der Technik umfangreich beschrieben (siehe z.B. Q. Bi et al., Applied Biochemistry & Biotechnology, 95(1) (2001) 23-30; D. Macmillan et al., Chemistry & Biology, 8(2) (2001) 133-45; J.E. de Oliveira et al., Journal of Chromatography, A, 852(2) (1999) 441-50 und M. Schmidt et al., Journal of Biotechnology, 68(1) (1999), 71-83). Auf diese Weise wurde beispielsweise rekombinantes humanes Erythropoietin, rekombinantes humanes Insulin sowie rekombinantes humanes Wachstumshormon hergestellt.

20

25

30

Die Gewinnung der in den Zellen produzierten Verbindungen, insbesondere wenn es sich um intrazellulär synthetisierte Substanzen handelt, bedingt in der Regel, dass die Zellen bzw. Bakterien lysiert werden müssen. Eine

solche Lyse ist immer dann zwingend, wenn die gewünschten Verbindungen nicht aus der lebenden Zelle ausgeschleust werden können. In diesem Fall können die gewünschten Verbindungen nur durch Lyse freigesetzt und der weiteren Verarbeitung (down-stream processing) 5
zugeführt werden.

Um eine Lyse der Zellen zu bewirken, können beispielsweise Enzyme, wie etwa Lysozym, zugesetzt werden, welche die Zellhülle lysieren, wobei eine Lyse durch induzierte Lysozym-Expression nicht erreicht werden konnte. Ist 10
die Zellhülle zerstört, kann die Zelle als "aufgeschlossen" gelten (T. R. Hopkins, Bioprocess Technology (New York) 12 (1991), 57-83; J.A. Asenjo et al., Bioprocess Technology (New York) 9 (1990) 143-75). Zur Lyse können auch Verfahren eingesetzt werden, bei denen mechanische Scherkräfte zur Zerstörung der Zellen zur Wirkung kommen. Ein Beispiel für 15
ein solches Verfahren ist die Verwendung einer French Press.

Der Aufschluss von Bakterien in biotechnologischen Produktionsprozessen stellt einen erheblichen Kostenfaktor dar. Zudem treten bei den bekannten Zellaufschlussverfahren oftmals störende Nebeneffekte auf, wie 20
beispielsweise starke Proteolyse oder das überstarke Vorhandensein von Zelltrümmern.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, ein verbessertes Verfahren für einen Zellaufschluss bereitzustellen, insbesondere ein 25
Verfahren, welches in biotechnologischen Produktionsprozessen vorteilhaft eingesetzt werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung von Substanzen, die an Bestandteile des Cytoskeletts, insbesondere an EF-Tu 30
binden zum Zellaufschluss.

Die Entdeckung der Existenz eines bakteriellen Cytoskeletts und die Charakterisierung von Bestandteilen davon, insbesondere die Charakterisierung des Elongationsfaktors EF-Tu als einem strukturell bedeutsamen Protein für dieses Cytoskelett öffnen den Weg für ein neues System für den Zellaufschluss, insbesondere den Zellaufschluss von Bakterien. Damit wird erfindungsgemäß eine Alternative zu konventionellen Zellaufschlussverfahren bereitgestellt. Durch Destabilisierung des Cytoskeletts kann die Zellhülle zerstört und somit eine Lyse der Zellen bewirkt werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt werden zur Destabilisierung des Cytoskeletts Substanzen verwendet, die an EF-Tu binden.

Das bakterielle Protein EF-Tu enthält die Domänen 1, 2 und 3 (H. Song et al., J. Mol. Biol. 285 (1999) 1245-1256). Die Sequenzen des Proteins EF-Tu und seines codierenden Gens sind für Escherichia coli und eine Reihe anderer Eu-Bakterien publiziert und in Datenbanken zugänglich. EF-Tu ist ein Protein, welches drei Domänen enthält. Von den 394 Aminosäuren, welche EF-Tu (von E.coli) umfasst, gehören zur Domäne 1 die Aminosäuren 8 bis 204, wobei die Aminosäuren 172 bis 204 eine Verbindungsstruktur zur Domäne 2 bilden. Zur Domäne 2 gehören die Aminosäuren 205 bis 298 und zur Domäne 3 gehören die Aminosäuren 299 bis 394.

Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass man beim bakteriellen Cytoskelett durch Hemmung des Self-Assembly von EF-Tu-Fibrillen eine Destabilisierung und in der Folge eine Lyse der Zellen erreichen kann.

EF-Tu ist ein 3-Domänen-Protein, wie in Figur 1 dargestellt. Die Protofilamente des Cytoskeletts entstehen in der lebenden Zelle dadurch, dass die Domänen 2 und 3 von EF-Tu-Proteinen (Monomer oder integriert in ein Protofilament und nur transient frei) mit den Domänen 3 und 2

benachbarter EF-Tu-Proteine wechselwirken. Durch Ausbildung spezifischer nicht-kovalenter Bindungen, wobei Domäne 2 des einen EF-Tu mit Domäne 3 des benachbarten EF-Tu wechselwirkt, während eines self assembly Prozesses entstehen auf diese Weise Ketten, sogenannte Protofilamente, welche sich zu einem Netzwerk verbinden (vgl. Figur 2). Mit diesem Netzwerk können weitere Faktoren assoziiert sein, wie z.B. FtsZ, MreB oder/und M6I.

Stabilität und/oder Ausprägung solcher Protofilamente und Netzwerke in Bakterienzellen können erfindungsgemäß unterbunden werden, wobei als Folge der Tod der Bakterienzelle durch Lyse eintritt.

Eine besonders vorteilhafte Vorgehensweise der Erfindung ist wie folgt. Der DNA-Abschnitt des EF-Tu-Gens von *Escherichia coli*, welcher für die Domäne 3 codiert, wird gewonnen und mittels molekulargenetischer Techniken in *E.coli*-Zellen transferiert und exprimiert. Neben diesem rekombinanten Abschnitt, welcher ausschließlich die Domäne 3, nicht aber die Domänen 1 und 2 von EF-Tu enthält, verfügen die Zellen nach wie vor über das native EF-Tu-Gen und können es exprimieren. Die zusätzlich synthetisierten Domäne 3-Polypeptide konkurrieren jedoch mit den nativen EF-Tu-Proteinen um die Bindungsplätze für die Ausbildung der Protofilamente. Wird ein Domäne-3-Polypeptid anstelle eines nativen EF-Tu-Proteins als Kettenglied eingebaut, führt dies aufgrund des Fehlens der zweiten Bindestelle (die Domäne 2 ist für die Kettenbildung unabdingbar) am Domäne-3-Polypeptid zum Kettenabbruch. Das Protofilament wächst nicht weiter, das cytoskelettale Netzwerk wird geschwächt und kollabiert schließlich. Als Folge des Verlustes der Integrität des Cytoskelettes verliert die cytoplasmatische Membran der Zelle ihre Aufhängung. Die cytoplasmatische Membran ist, wie aus Figur 4 ersichtlich, am Cytoskelett aufgehängt. Dadurch wird die Zellwand, die in der lebenden Bakterienzelle durch die cytoplasmatische Membran positioniert und gestützt wird, zerstört (siehe Figur 5). Der Verlust von Zellwand und cytoplasmatischer Membran

bedeutet eine Exposition des Zellinhalts, sodass die Zelle lysiert ist (vgl. Figuren 5 und 6). Der Zellinhalt kann somit ohne weiteren Zellaufschluss gewonnen werden.

5 Zellen, welche für biotechnologische Produktionsprozesse eingesetzt werden, wie etwa heterologe Expression, Produktion von Proteinen, insbesondere für biotechnologische oder medizinische Zwecke, können somit aufgeschlossen werden, indem man in sie vor ihrem Einsatz für die Produktion eine Sequenz einbringt, welche für die der Zellen-Species
10 entsprechende Domäne des EF-Tu codiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten die zum Zellaufschluss verwendeten Substanzen Anteile, die im Bereich der Aminosäuren 218 bis 224 von Domäne 2 und/oder im Bereich der Aminosäuren 317 bis 328
15 oder/und 343 bis 354 von Domäne 3 an EF-Tu binden. Innerhalb der Domänen 2 und 3 treten unterschiedliche Sekundärstrukturen auf. Von besonderem Interesse sind dabei die Aminosäuresequenzen von 317 bis 328 und von 343 bis 354, welche in Domäne 3 liegen und Schleifen bilden, die frei in den Raum ragen und Kandidatensequenzen für eine
20 Wechselwirkung mit Aminosäuresequenzen sind, welche in einer entsprechend positionierten Eindellung an der Peripherie von Domäne 2 liegen, wobei diese Sequenzen von Aminosäuren 218 bis 224 reichen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden intrazellulär
25 exprimierte peptidische Substanzen eingesetzt, welche auf Oligopeptiden basieren, welche an EF-Tu, vorzugsweise im Bereich der Passungsstellen der Domänen 2 oder/und 3 binden. Diese Oligopeptide können Teilabschnitte der Aminosäuresequenzen der Domänen 2 oder/und 3 mit einer Länge von vorzugsweise 4 bis vorzugsweise 20 Aminosäuren,
30 besonders bevorzugt 5 bis 15 Aminosäuren und insbesondere bevorzugt mit einer Länge von 6 bis 12 Aminosäuren enthalten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthalten die Substanzen Teilabschnitte oder den Gesamtbereich der Aminosäuresequenzen aus der Domäne 3 mit einer Länge von mindestens 4 und insbesondere mindestens 5 Aminosäuren und der gleichzeitig keinem Abschnitt der Aminosäuresequenzen aus der Domäne 2 entspricht.

Neben intrazellulär exprimierten peptidischen Verbindungen können auch intrazellulär exprimierte Peptidomimetika vorteilhafterweise eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Aufschluss von Zellen, bei dem man in den Zellen Bestandteile des Cytoskeletts destabilisiert. Cytoskelettale Elemente, die verändert werden können, um eine Schwächung des Cytoskeletts zu bewirken, umfassen beispielsweise FtsZ, MReB, Mbl und kontraktile Proteine und insbesondere EF-Tu.

Besonders bevorzugt werden bei diesem Verfahren Substanzen eingesetzt, welche an Bestandteile des Cytoskeletts, insbesondere an EF-Tu binden und hierin zuvor erläutert sind.

Die Erfindung kann besonders vorteilhaft angewendet werden in einem Verfahren zur Herstellung einer Verbindung, beispielsweise eines Proteins, indem man Zellen verwendet, in welchen dieses Protein, beispielsweise durch einen biotechnologischen Produktionsprozess exprimiert wird und indem man in diese Zellen zuvor eine Sequenz einbringt, die für eine Substanz codiert, welche Bestandteile des Cytoskeletts der Zellen destabilisiert. Die bei einer herkömmlichen biotechnologischen Prozessführung zur Gewinnung der gebildeten Verbindungen in gentechnisch manipulierten Bakterien üblicherweise erforderliche Lyse kann hier mit dem hierin beschriebenen Zellaufschluss durchgeführt werden. Vorteilhaft ist, dass der Zellaufschluss zu einem genau definierten Zeitpunkt durchgeführt werden kann. Ein Indikator hierfür kann das

Erreichen der gewünschten Zelldichte (quorum sensing) sein. Eine Induktion der Lyse durch quorum sensing erfolgt dadurch, dass die Zellkultur in ihrem Wuchsverhalten kontrolliert wird und bei Feststellung, dass der gewünschte Zustand der Zellkultur erreicht ist, das eingebrachte Gen exprimiert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird in die Zellen ein Konstrukt eingebracht, welches neben dem Gen für die destabilisierende Substanz weitere codierende Sequenzen enthält, die es erlauben, den Beginn der Synthese der Substanz, beispielsweise des Domäne-3-Polypeptids von außen zu induzieren. Auf diese Weise ist es möglich, den Zeitpunkt der Zell-Lyse in der Zellkultur von außen exakt zu steuern.

Die Induktion durch einen quorum-gekoppelten oder/und Zellkultur-autarken Prozess ist eine weitere geeignete Form zur Einleitung der Zell-Lyse.

Die Erfindung umfasst weiterhin ein Konstrukt, umfassend eine Sequenz, welche für eine Bestandteile des Cytoskeletts von Zellen destabilisierende Substanz codiert. Dieses Konstrukt umfasst bevorzugt weiterhin mindestens einen Genabschnitt, welcher die Induktion der Synthese der das Cytoskelett destabilisierenden Substanz erlaubt.

Vorteilhafte Auslegungen des Konstrukts sind in Figur 7 dargestellt. Sobald die Induktion erfolgt ist, wird innerhalb einer Zellgeneration durch das Zusammenspiel von EF-Tu, Domäne-3-Polypeptid, cytoplasmatischer Membran und Zellwand die Lyse der Zellen herbeigeführt.

Die Erfindung wird durch die beigefügten Figuren und die nachfolgenden Beispiele weiter erläutert.

In den Figuren zeigt:

Fig. 1

- a) EF-Tu (GDP-Form aus E.coli; Ergebnis einer Röntgenstrukturanalyse; Abbildung aus der Literatur entnommen und modifiziert). Die 3 Domänen des Proteinmoleküls sind markiert. A' und b bezeichnen Verbindungssequenzen
- b) Wie a), jedoch andere Form der Darstellung. Die Zahlen markieren die Positionen der Aminosäure-Reste; N-Terminus und C-Terminus sind angegeben.

Fig. 2

- a) EF-Tu-Molekül
- b) und c) Prinzip der "Kettenbildung" (Self-Assembly von EF-Tu-Monomeren zu Protofilamenten). Die Bindung erfolgt durch Kontakt zwischen den Domänen 2 und 3 benachbarter Moleküle
- d) Elektronenmikroskopische Abbildung eines solchen Protofilaments, isoliert aus dem Bakterium *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*
- e) Netzwerk, bestehend aus Protofilamenten. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines aus dem Bakterium *Th. Thermosaccharolyticum* isolierten Netzwerks. Die schwarzen Punkte sind für Markierungszwecke eingesetzte Gold-Marker.

Fig.3

Es sollen EF-Tu-GFP-His-Fusionsklone generiert werden. Idealer Fusionspunkt bei EF-Tu ist der C-Terminus, der zwischen Domäne 2 und 3 hervorragt (Song et al., 1999). Der gleiche Fusionspunkt kann auch für ein Domäne-3-Fusionskonstrukt gewählt werden. Das Domäne-3-Fusionskonstrukt kann für in vivo-Kompetitionsexperimente eingesetzt werden. Dabei scheint es sinnvoll, für chemische Labeling-Alternativen ein C-terminales Cystein (das einzige in Domäne 3) einzuführen.

Ausgangspunkt ist genomische DNA eines E.coli-K-12-Stammes. Im Hinblick auf mögliche, spätere Experimente in vitro erscheint es sinnvoll, alle Konstrukte auch mit His-Tag zu versehen.

(a1) Einführung eines His-Tag in die BsrGI/EcoRI-Schnittstellen des Vektors pEGFP

(a2) Einführung des EF-Tu-Gens in die HindIII/NcoI-Schnittstellen des Vektors pEGFP(His)

(a3) Einführung des Domäne-3-Genabschnitts in die HindIII/NcoI-Schnittstellen des Vektors pEGFP(His)

(b1) Basensequenz des Konstruktes pEGFP-EF-Tu-His am Beispiel des Klons HE1

(b2) Basensequenz des Konstruktes pEGFP-Domäne3-His am Beispiel des Klons HD1

Fig. 4

"Aufhängung" der cytoplasmatischen Membran (CM) bei dem wandlosen Bakterium *Mycoplasma pneumoniae*. Elektronenmikroskopische Aufnahmen.

a) Unbehandeltes Bakterium. Der Pfeil deutet auf die CM

b), c), d) Nach Ablösen der CM (durch ein Detergenz) wird erkennbar, dass die CM an Stützen ("stalks") aufgehängt war, welche ihrerseits dem peripheren Teil des Cytoskeletts aufsitzen. Wird dieser Teil des Cytoskeletts geschwächt oder zerstört, verlieren die "stalks" ihre feste Verankerung und die CM kollabiert.

Fig. 5

Versuche mit E.coli. Elektronenmikroskopische Aufnahmen, Negativkontrastierung

a) Intakte Bakterienzellen, enthaltend ihr Chromosom und zusätzlich einen Leervektor (Plasmid), welcher in weiterführenden Versuchen als Vektor zum Einbringen des Domäne-3-Genabschnitts verwendet wurde. Diese Zellen stellen also Kontrollen dar.

- b) Zellen einer jungen Kultur. In diese Zellen war vor Beginn der Kultivierung zusätzlich zum eigenen nativen Chromosom (welches ja das Gen enthält, welches intaktes EF-Tu codiert) ein Plasmid eingebracht worden, welches in exprimierbarer Form den Genabschnitt enthält, welcher für Domäne-3 von EF-Tu codiert. Der Effekt der Expression dieses "truncated" Gens ist deutlich zu sehen: Neben einigen intakt erscheinenden Zellen (sie sind bei genauerer Analyse als bereits in ihrer Zellhülle geschwächt erkennbar), wird das Bild bestimmt durch Zellreste, welche noch die ursprüngliche Zellform erkennen lassen, jedoch weder Wand noch CM besitzen. Wand und CM haben durch die Destabilisierung des Cytoskeletts ihre Aufhängung verloren. Der Zellinhalt ist exponiert. Ein solcher Zustand wird gemeinhin als "aufgeschlossen" bezeichnet.
- c) Endstadium der Auflösung der Zellen (alte Kultur). Eine ehemalige Zellform ist nicht mehr erkennbar; die Zellreste bilden unorganisierte Aggregationen

Fig. 6

Versuche mit E.coli. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

- a) Endstadium der Auflösung der Zellen einer Kultur, in denen Domäne 3 von EF-Tu zusätzlich zum zelleigenen EF-Tu exprimiert wurde; Ultradünnschnitt (vgl. Abb. 5 b) und c))
- b) Kontrolle: Zelle mit Leervektor; die Zelle ist intakt (vgl. Abb. 5 a))
- c) Kontrolle: In der Zelle wurde zusätzlich zum zelleigenen EF-Tu noch per genetic engineering eingebrachtes EF-Tu exprimiert; die Zelle ist intakt

Fig. 7

Chromosomale Integration eines möglichen Konstrukts der Domäne 3 von Ef-Tu mit regulierbarem Promotor und Resistenzmarker unter Zuhilfenahme der Attachment sites des Phagen Lambda. Promotor und Resistenz können je nach Bedarf auch in anderen Kombinationen eingesetzt werden.

Att	attachment sites
Spec R	Spektinomycin-Resistenz
LacI	Repressor
P _{LacO-1}	modifizierter Lac-Promotor (nach LUTZ und BUJARD, 1997)

5

Als Alternativen zum angegebenen Promotor können beispielsweise auch die Promotoren ara, T7 oder bdA (quorum sensing) eingesetzt werden.

Beispiele

10

Beispiel 1

Ablauf von der Klonierung bis zur Expression und Aufreinigung der Konstrukte EF-Tu-His bzw. Domäne 3-His (schematisiert):

15

20

25

30

1. Präparation der genomischen DNA von E.coli XL1-Blue (K12-Derivat)
2. PCR mit den entsprechenden Primern zur Hochverstärkung der Volllängenprodukte
3. Identifizierung und Aufreinigung der PCR-Volllängenprodukte
4. Restriktionsverdau der PCR-Produkte und des Zielvektors
5. Ligation der PCR-Produkte in den Zielvektor
6. Elektroporation der ligierten Plasmid-DNA in den Stamm XL1-Blue
7. Identifizierung der Klone mit dem richtigen Insert durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse
8. Sicherung der Klone als Kryokulturen
9. Ausplattierung der Klone auf Selektionsagar (hier: LB/Ampicillin) und Anzucht über Nacht bei 37 °C
10. Animpfen einer 50 ml LB/Ampicillin-Flüssigkultur, Inkubation über Nacht bei 37 °C
11. Animpfen einer 1 l LB/Ampicillin-Flüssigkultur, Inkubation bei 37 °C bis zu einer OD600 von ca. 0,5 bis 0,7, Induktion mit IPTG für mindestens 4 h
12. Zellernte
13. Homogenisierung durch Druck/Ultraschall

14. Abzentrifugieren der Zelltrümmer
15. Aufreinigung des so geklärten Zelllysats über IMAC-Säulen

IPTG Isopropylthiogalaktosid

5 IMAC Ion Metal Affinity Chromatographie

Ansprüche

1. Verwendung von Substanzen, die an Bestandteile des Cytoskeletts,
insbesondere an EF-Tu binden, zum Zellaufschluss.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zum Zellaufschluss von
Bakterienzellen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Substanzen im Bereich der Domäne 2 (Aminosäuren 205 bis
298) oder/und der Domäne 3 (Aminosäuren 299 bis 349) an EF-Tu
binden.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Substanzen im Bereich der Aminosäuren 218 bis 224 von
Domäne 2 oder/und im Bereich der Aminosäuren 317 bis 328
oder/und 343 bis 354 von Domäne 3 an EF-Tu binden.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Substanzen Teilabschnitte der Aminosäuresequenzen aus
den Domänen 2 oder/und 3 mit einer Länge von mindestens vier
Aminosäuren enthalten.
6. Verwendung nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Teilabschnitte eine Länge von 5 bis 15 Aminosäuren,
insbesondere von 6 bis 12 Aminosäuren aufweisen.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Substanzen die Domäne 3 von EF-Tu und keine weitere
Domäne von EF-Tu enthalten.
- 5
8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Substanzen ausgewählt werden aus linearen oder
cyclischen peptidischen Verbindungen oder Peptidomimetika.
- 10
9. Verfahren zum Aufschluss von Zellen,
dadurch gekennzeichnet,
dass man in den Zellen Bestandteile des Cytoskeletts destabilisiert.
- 15
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass man zur Destabilisierung Substanzen einsetzt, welche an
Bestandteile des Cytoskeletts binden.
- 20
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass man Substanzen, die an EF-Tu binden einsetzt.
- 25
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass man Substanzen einsetzt, die im Bereich der Domäne 2
(Aminosäuren 205 bis 298) oder/und der Domäne 3 (Aminosäuren
299 bis 394) an EF-Tu binden, insbesondere im Bereich der
Aminosäuren 218 bis 224 von Domäne 2 oder/und im Bereich der
Aminosäuren 317 bis 328 oder/und 343 bis 354 von Domäne 3.
- 30
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 oder 13,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass man Substanzen einsetzt, welche Teilabschnitte der
Aminosäuresequenzen aus den Domänen 2 oder/und 3 mit einer
Länge von mindestens 4 Aminosäuren, insbesondere von mindestens
5 Aminosäuren enthalten.

5

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass Nukleinsäuren in die Zellen eingebracht werden, die für die das
Cytoskelett destabilisierenden Substanzen codieren.

10

15. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass man Zellen verwendet, in welche eine Sequenz eingebracht
worden ist, codierend für eine Verbindung, welche Bestandteile des
Cytoskeletts der Zellen destabilisiert, die Zellen kultiviert und so die
gewünschte intrazelluläre Verbindung gewinnt.

15

16. Verfahren nach Anspruch 15,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass man die gewünschte Verbindung durch Kultivierung der Zellen
intrazellulär produziert und in einem zweiten Schritt eine Lyse der
Zellen durch Induktion der Expression der das Cytoskelett
destabilisierenden Verbindung bewirkt.

20

25

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 16,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass die gewünschte Verbindung durch heterologe Expression
gebildet wird.

30

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass die gewünschte Verbindung durch homologe Expression gebildet wird.

5 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Induktion durch quorum sensing erfolgt.

10 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
dass die für eine das Cytoskelett der Zellen destabilisierende
Verbindung codierende Sequenz in einem Konstrukt in die Zellen
eingebracht wird, wobei das Konstrukt weitere Regionen enthält, die
eine Induktion der Synthese der Verbindung erlauben.

15 21. Konstrukt, umfassend eine Sequenz, welche für eine Bestandteile
des Cytoskeletts von Zellen destabilisierende Verbindung codiert.

20 22. Konstrukt nach Anspruch 21, weiterhin umfassend einen
Genabschnitt, welcher die Induktion der Synthese der das
Cytoskelett destabilisierenden Verbindung erlaubt.

Zusammenfassung

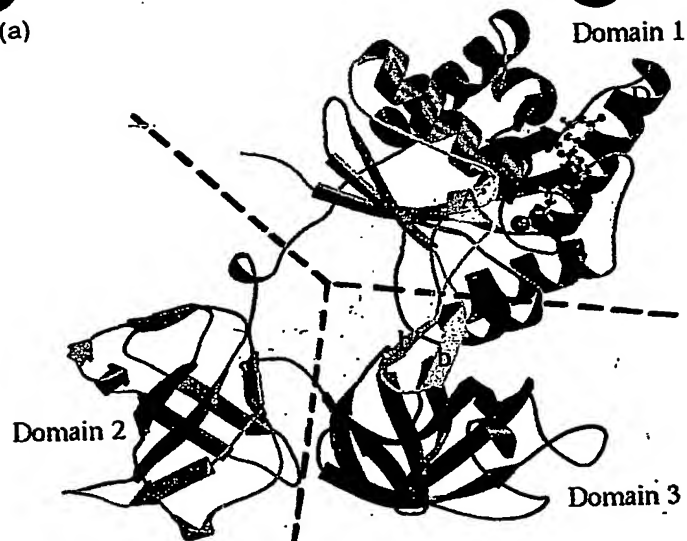
Die Erfindung betrifft die Verwendung von Substanzen, die an den
5 bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu binden zum Zellaufschluss bzw. zur
Lyse von Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Zellaufschlusssystem
bzw. ein Zellaufschlussverfahren.

10

sh/ANM/28099PDE/02.07.2002

Fig. 1

(a)



(b)

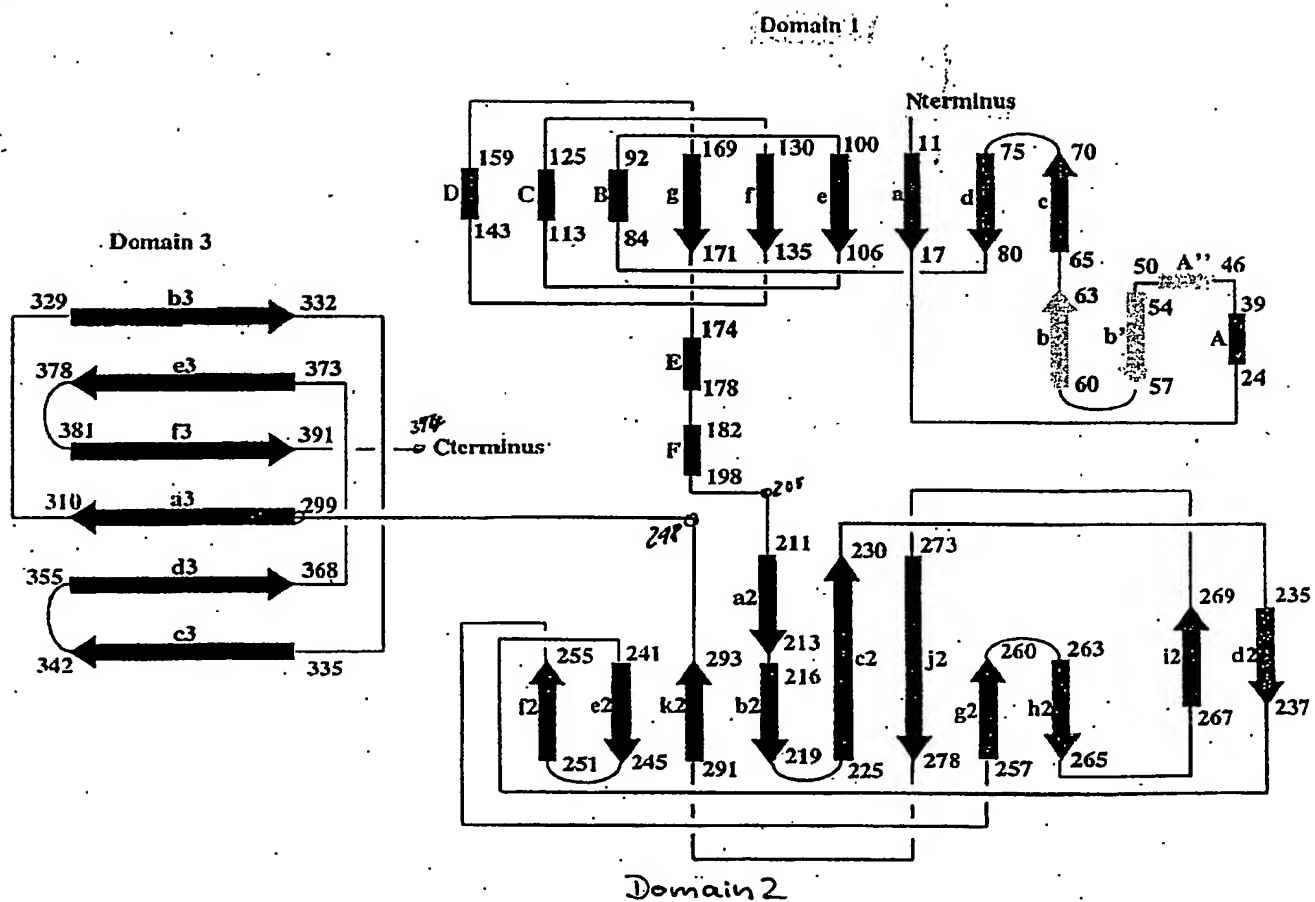


Fig. 2

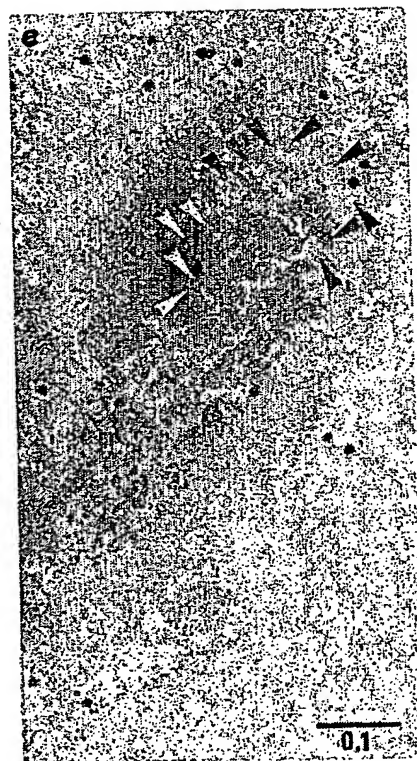
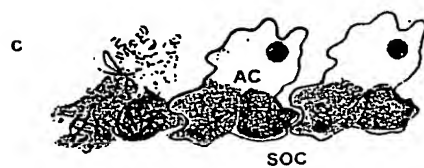
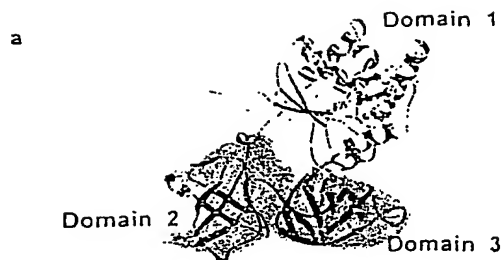


Fig. 3

(a1)

Vektor pEGFP (Clontech):

BsrGI STOP *EcoRI*
GAC GAG CTG TAC AAG TAA AGC GGC CGC GAC TCT AGA ATT CCA
CTG CTC GAC ATG TTC ATT TCG CCG GCG CTG AGA TCT TAA GGT

BsrGI-Schnittstelle:

T GTACA
ACATG T

EcoRI-Schnittstelle:

G AATTC
CTTAA G

Synthetisch hergestelltes Oligonukleotid zur Einklonierung des His-Tags in den Vektor:

5' *Bsr*GI *Bsr*GI *Eco*RI 3'
G TAC AAG CTT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA CTG TAC AAG TAAG
TTC GAA GTA GTG GTA GTG GTA GTG ATT GAC ATG TTC ATTCTTAA
3' Tyr-Lys-Leu-His-His-His-His-His-STOP-

Ergebnis: pEGFP(His)

(a2)

Vektor pEGFP(His):

GCC TGC AGG -%- ACC ATG GTG
CGG ACG TCC -%- TGG TAC CAC

PstI-Schnittstelle:

CTGCA G
G ACGTC

NcoI-Schnittstelle:

C CATGG
GGTAC C

Fusionsstellen zum EF-Tu-Gen:

[illegible]

(a3)

Fusionsstellen zur Domäne 3:

5'	<i>PstI</i>		<i>Cys HindIII</i>	<i>NcoI</i>	3'										
ACT	AGC	TGC	AGC	GCT	AAG	CCG	-8-	CTG	GGC	TGC	AAG	CTT	ACC	ATG	GTG
TGA	TCG	ACG	TCG	CGA	TTC	GGC	-8-	GAC	CCG	ACG	TTC	GAA	TGG	TAC	CAC
3'															5'

Thr-Ser-Cys-Ser-Ala-Lys-Pro-----Leu-Gly-Cys-Lys-Leu-Thr-Met-Val

Sequenz des Konstrukts EF-Tu-GFP-His im Vektor pEGFP (Clontech)

(b1)

pEGFP-Vektor:

AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCATTAA TGCAGCTGGC ACGACAGGTT TCCCGACTGG
AAAGCGGGCA GTGAGCGCAA CGCAATTAAAT GTGAGTTAGC TCACCTGATTA GGCACCCAG GCTTTACACT TTATGCTTCC
GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG ATAACAATTT CACACGGGA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTTG
CATGCCCTGCA GC

EF-Tu:

ATGTCATAAG AAAAATTGTA ACGTACAAA CCGCACGTTA ACGTTGGTAC TATCGGCCAC GTTGACCACG GTAAAACTAC
TCTGACCGCT GCAATCACCA CCGTACTGGC TAAAACCTAC GCGGGTGTG CTCGTGCATT CGACCAGATC GATAACGCGC
CGGAAGAAA AGCTCGTGGT ATCACCATCA ACACCTCTCA CGTTGAATA GACACCCCGA CCGGTCACTA CGCACACGTA
GACTGCCCGG GGCACGCCGA CTATGTTAAA AACATGATCA CCGGTGCTGC TCAGATGGAC GCGCGGATCC TGGTAGTTGC
TGCGACTGAC GGGCCGATGC CGCAGACTCG TGAGCACATC CTGCTGGGTC GTCAAGTAGG CGTTCCGTAC ATCATCGTGT
TCCTGAACAA ATGCGACATG GTTGATGACG AAGAGCTGCT GGAACCTGGT GAAATGGAAG TTCGTGAAC TCTGTCTCAG
TACGACTTCC CGGCGGACGA CACTCCGATC GTTCGTGGTT CTGCTCTGAA AGCGTGGAA GCGCAGCGAG AGTGGGAAGC
GAAAATCCTG GAACTGGCTG GCTTCCCTGGA TTCTTAATTT CCGGAACCCAG AGCGTGCAT TGACAAAGCCG TTCTCTGCTGC
CGATCGAAGA CGTATCTCC ATCTCCGGTC GTGGTACCGT TGTTACCGGT CTACCTGTAC TGGCGTTGAA ATGTTCCGCA AACTGCTGGA
GAAGAAGTTG AAATCGTTGG TATCAAAGAG ACTCAGAAGT CTACCTGTAC TGGCGTTGAA ATGTTCCGCA AACTGCTGGA
CGAAGGCCGT GCTGGTGAGA ACGTAGGTGT TCTGCTGCGT GGTATCAAAC GTGAAGAAAT CGAACGTGGT CAGGTACTGG
CTAAGCCCGG CACCATCAAG CCGCACACCA AGTTCGAATC TGAAGTGTAC ATTCTGTCCA AAGATGAAG CGGCCGTCAT
ACTCCGTTCT TCAAAGGCTA CCGTCCGCAG TTCTACTTCC GTACTACTGA CGTGACTGGT ACCATGAAC TGCCGGAAGG
CGTAGAGATG GTAATGCCGG GCGACACAT CAAAATGGTT GTTACCCCTGA TCCACCCGAT CGCGATGGAC GACGGTCTGC
GTTTCGCAAT CCGTGAAGGC GGCCGTACCG TTGGCGCGGG CGTTGTAGCT AAAGTTCTGG GC

pEGFP-Vektor:

AAGCTTACC

GFP:

ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTACC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT CGAGCTGGAC GCGGACGTAA ACGGCCACAA

GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCTGAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC
TGCCCGTGCC CTGGCCACC CTGCTGACCA CCTGACCTA CGCGTGCAG TGCTTCAGCC GTTACCCCGA CCACATGAAG
CAGCAGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC TTCAAGGACG ACGCAACTA
CAAGACCCGC GCCAGGTGA AGTTCGAGG CGACACCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG
ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC
GGCATCAAGG TGAACCTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC GACCACCTACC AGCAGAACAC
CCCCATCGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG
AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA TGGACGAGCT GTACAAG

His-Tag:

CTTCATCACC ATCACCATCA CTAACGTGAC AAGTAAGAAT CC

pEGFP-Vektor:

CAACTGAGCG CCGTCGCTA CCATTACCA CTTGCTCTGGT GTCAAAAATA ATAGGCCTAC TAGTCGGCCG TACGGGCCCT
TTCTGCTCGC GCGTTTCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG ACACATGCAG CTCCCGGAGA CGGTCACAGC TTGTCGTGTA
GCGGATGCCG GGAGCAGACA AGCCCGTTCAG GGCGCGTCAG CCGGTGTGCG GGTGGCTTA ACTATGCGGC
ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GATGCAACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAA TACCGCATCA
GGCGGCCTTA AGGCGCTCGT GATACGCCCTA TTTTATATAGG TTAATGTCTAT GATAATAATG GTTTCCTTGA CGTCAGGTGG
CACTTTTCGG GGAATATGTC GCGGAACCCC TATTTGTGTTA TTTTCTCTAAA TACATTCAA TATGTATCCG CTCATGAGAC
AATAACCCCTG AATAATGCTT CAATAATATT GAAAAAGGAA GAGT

CCCTCCCGTA TCGTAGTTAT CTACAGCAG GGGAGTCAGG CAACTATGGA TGAACGAAAT AGACAGATCG CTGAGATAGG

Die Sequenz enthält vier silent mutations (rot unterlegt), die laut Sequenzanalyse eindeutig vorhanden sind:

- (1) Soll: TAT, Ist: TAT -> Tyr; Codon usage (gesamtes Genom E. coli) ändert sich von 16,2 zu 12,2
 - (2) Soll: TAC, Ist: TAT -> Tyr; Codon usage (gesamtes Genom E. coli) ändert sich von 12,2 zu 16,2
 - (3) Soll: GCA, Ist: GCG -> Ala; Codon usage (gesamtes Genom E. coli) ändert sich von 20,1 zu 33,6
 - (4) Soll: ATT, Ist: ATG -> Ile; Codon usage (gesamtes Genom E. coli) ändert sich von 30,3 zu 25,1
- (Frequenz pro Tausend)

Sequenz des Konstrukts Domäne 3 von EF-Tu-GFP-His im Vektor pEGFP
(b2) (Clontech)

pEGFP-Vektor:

AGCGCCCAAT ACGCAAAACG CCTCTCCCG CGGTTGGCC GATTCAATTAA TGCAGCTGGC ACGACAGGTT TCCCGACTGG
AAAGCGGGCA GTGAGCGCAA CGCAATTAAAT GTGAGTTAGC TCACTCATTA GGACCCCGAG GCTTTAGACT TTATGCTTGC
GGCTGCTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG ATAACAATTT CACACAGGAA ACAGCTATGA CCAATGATTAC GCCAAGCTTG
CATGCCTGCA GC

Domäne 3 von EF-Tu:

GCTAAGCCCG GCACCATCAA GCCGCACACC AAGTTCGAAT CTGAAGTGTA CATTCTGTCC AAAGATGAAG GCGGCCGTCA
TACTCCGTTT TTCAAAGGCT ACCGTCCGCA GTTCTACTTC CGTACTACTG ACGTGACTGG TACCATGAA CTGCCGGAAG
GCGTAGAGAT GGTAATGCCG GCGGACAACA TCAAAATGGT TGTTACCCCTG ATCCACCCCGA TCGCGATGGA CGACGGTCTG
CGTTTCGCAA TCCGTGAAGG CGGCCGTACC GTTGGCGCGG GCGTTGTAGC TAAAGTTCTG GGCTGC

pEGFP-Vektor:

AAGCTTACC

GFP:

ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTTCACC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT CGAGCTGGAC GCGGACGTAA ACGGCCACAA
GTTTCAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC
TGCCCGTGCC CTGGCCCAACC CTCGTGACCA CCCTGACCTA CGGCGTGCAG TGCTTCAGCC GTACCCCGA CCACATGAAG
CAGCACGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC TTCAAAGGACG ACGGCAACTA
CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG CGACACCCCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG
ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC
GGCATCAAGG TGAACCTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGACGCT GCAGCTCGCC GACCACTACC AGCAGAACAC
CCCCATCGGC GACGGCCCGG TGCTGTGTGCC CGACAACCAC TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG
AGAAAGCGCA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCCG CGCCGGGATC ACTCTCGGCA TGGACGAGCT GTACAAAG

His-Tag:

CTTCATCACC ATCACCATCA CTAACGTGTAC AAGTAAGAAT CC

10/15

ט

[illegible]

11/15

Sequenz: GGCC TTTTGCTGGC CTTTGTCTCA CATGTTCTTT CCTGCGTTAT CCCCTGATTTC TGTGGATAAC
CGTATTACCG CCTTGAAGTG AGCTGATACC GCTCGCCGCA GCCGAACGAC CGAGCGCAGC GAGTCAGTGA GCGAGGAAGC
GGAAG

Sequenz: Lac-Promoter

Sequenz: Lac-Operator

Sequenz: Ribosome Binding Site

Sequenz: Ampicillin-Resistenz-Gen

Sequenz: pUC Plasmid Replication Origin

Cloning sites:

1. CTGCAG PstI
2. CCATGG NcoI
3. TGTACA BsrGI
4. GAATCC EcoRI

Die Sequenz enthält eine silent mutation (rot unterlegt), die laut Sequenzanalyse eindeutig vorhanden sind:

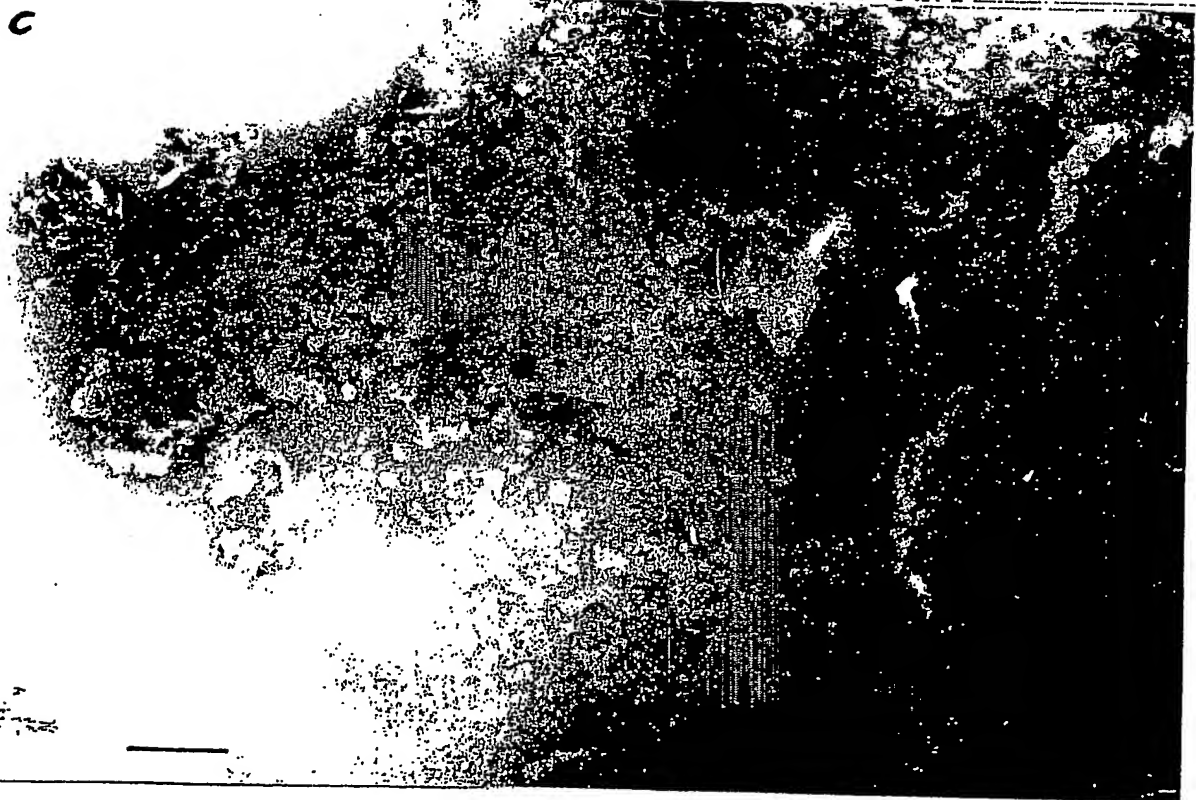
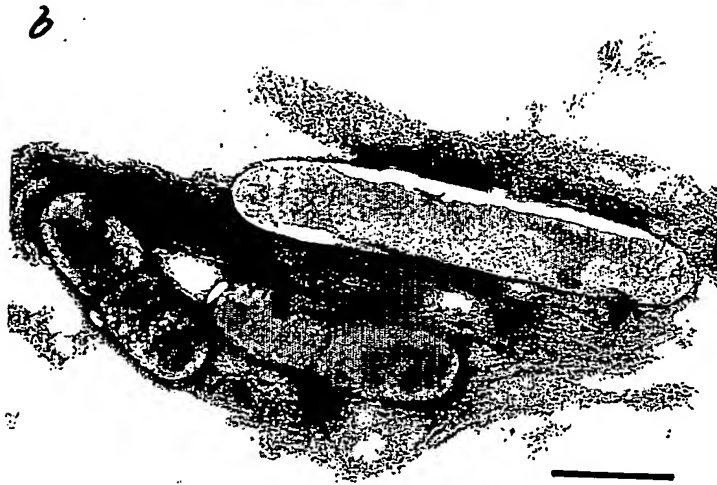
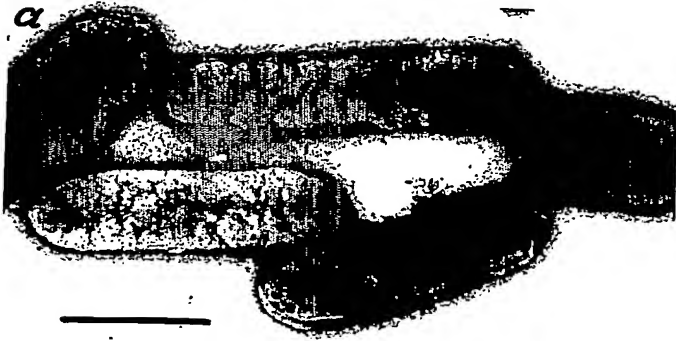
Soll: ATT, Ist: AT **A** -> Ile; Codon usage (gesamtes Genom E. coli) ändert sich von 30,3 zu 25,1 (Frequenz pro Tausend)

12/15

Fig. 4



Fig. 5



14/15

Fig. 6

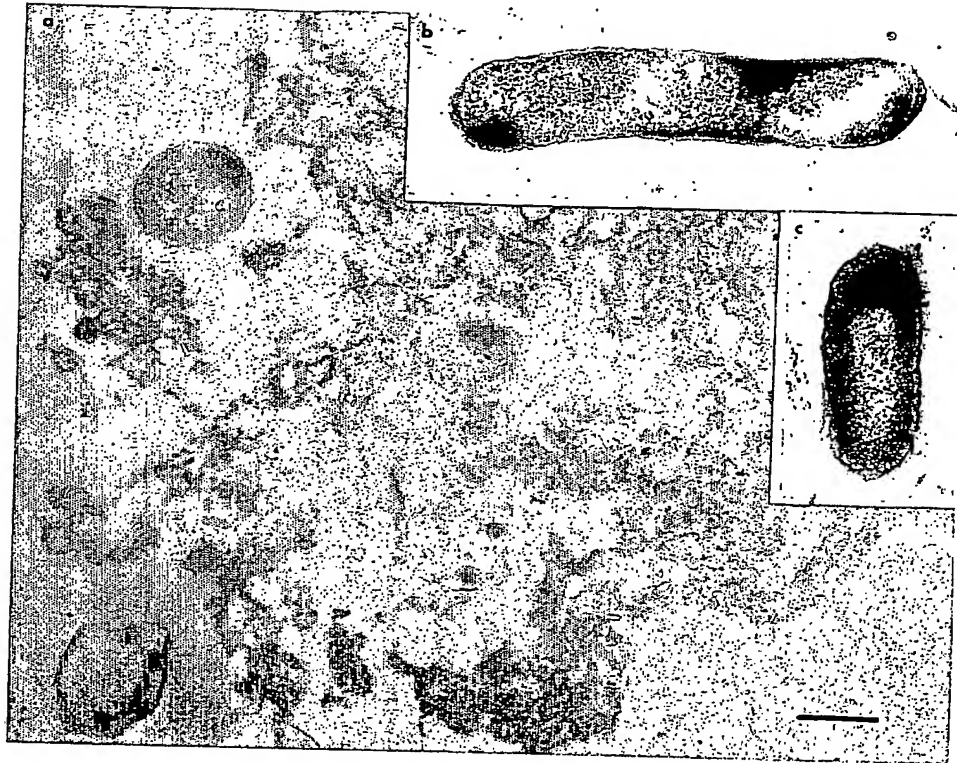
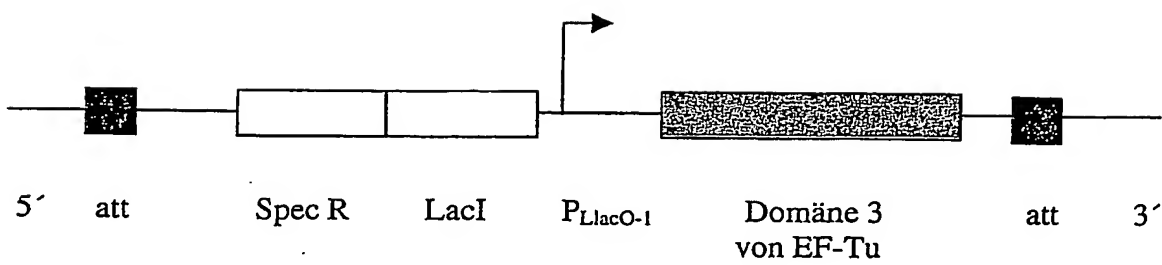


Fig. 7



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.